

各種 食品中の 有毒性 眞菌에 關한 研究

Ⅳ. Aflatoxin樣物質의 分泌菌株의 檢索

延世大學校 醫科大學 微生物學敎室

高春明 · 崔泰周 · 柳 駿

Studies on the Population of Toxigenic Fungi in Foodstuffs

Ⅳ. Screening test for strains that produce aflatoxin like substances

Choon-Myung Koh, Tae-Joo Choi and Joon Lew

Dept. of Microbiology, Yonsei University, College of Medicine

Abstract : Fifty-eight strains of *Aspergillus* spp. isolated from various grains were examined for the screening of aflatoxins by the method of the Thin-Layer Chromatography (TLC), using the aflatoxin producing strain of *Aspergillus flavus* ATCC 15517 as a control.

The results as follows:

1. Samples of *Aspergillus* spp. isolated from various grains were extracted with chloroform and chromatographed by the thin-layer chromatography method.
2. Three strains of *Aspergillus* spp. among the 58 strains can be found that the spots having the same Rf value as control with culture extract of *Aspergillus flavus* ATCC 15517.
3. The further prove studies of aflatoxins were proceed by the methods of in vivo and in vitro tests. And this methods considered to capable for the use of mass screening among the samples.

緒 論

眞菌類의 數種, 특히 *Aspergillus* spp.와 *Penicillium* spp.의 一部 菌株들이 發癌物質의 一種이라고 일컬어지고 있는 aflatoxin을 分泌한다는 報告가 있는 후 (Ashworth 및 McMeans, 1966; Asplin 및 Carnaghan, 1961; Austwick 및 Ayerst, 1963; Blount, 1961; Diener等, 1963; Hesseltine等 1966; Hodges等, 1964; Mislivec等, 1968), 이에 對한 많은 研究가 實施되어 aflatoxin을 分泌하는 眞菌의 種類, 分布, 同定 및 分

析方法 그리고 aflatoxin의 生化學的 特性 등에 對하여 많은 究明이 이루어졌다(Andrellos 및 Reid,等 1964; Asao等, 1963, Boller 및 Schroedler, 1966; Broadlent等, 1963; Brown 및 Abrams, 1966; Carnaghan等 1963; Cheung等, 1965; Jarvis, 1971; Lie 및 Marth, 1967; Schroeder, 1966).

그러나 우리나라에서는 아직도 醱酵食品의 開發의 미비로 自然狀態의 眞菌類를 그대로 利用하고 있는 形편이며 이에 對한 연구도 아직 많이 이루어져 있지 않은 形편으로 이는 國民 保健에 많은 問題點을 나타내고 있다고 하겠다.

日本에서 Murakami等(1967, 1968)은 日本의 醱酵食品에 關係되는 *Aspergillus* spp. 중에서는 aflatoxin을 發見할 수 없었다고 하였으나, Kurata等(1968)은 日本의 食品中에서 aflatoxin 分泌菌株를 검출할 수 있었으며 이를 利用하여 aflatoxin의 同定과 動物實驗을 통한 一聯의 實驗 結果로서 日本內의 aflatoxin의 存在를 주장하였다.

한편, 그 以外의 여러나라에서도 여러 學者들(Diener, 1960; Cooms等, 1965; Schindler 및 Eisenberg, 1968; Scott, 1968; Callete等, 1968; Jackson, 1968; Brown等, 1968; Mayer, 1968; Mayura 및 Sreenivasamurthy, 1969; Pons, 1969; Scott, 1969)에 依하여 aflatoxin의 檢出이 여러 種류의 穀類, 食品等에서 可能하다고 報告한 바 있다.

우리나라의 경우에서는 aflatoxin의 分泌可能菌株의 檢出 報告는 있으나(權, 1969; 柳等, 1970; 高 및 柳 1970, 1971; 과학기술처, 1970) 아직까지 aflatoxin을 檢出하였다는 報告는 없는것 같다(李 및 李, 1969; 李等, 1971; 沈 등, 1969).

또한, 이의 檢出方法도 그동안 많은 學者들에 依하여 發展을 가져와서 여러가지 方法에 依하여 검출하고 있으나 이는 많은 기재와 시간의 소모가 필요한 短點 역시 가지고 있는 實情이다.

이에 著者等은 많은 材料를 處理할 수 있고 比較的 간단한 方法에 依하여 mass screening 할 目的으로 Nesbitt等(1962)이 使用한 screening 方法을 변화시켜 實驗을 실시하였던 바 그의 結果를 얻을 수 있었기에 여기 報告하는 바이다.

實驗材料 및 方法

A. 實驗材料

1. 實驗에 使用된 菌株 :

實驗에 使用된 菌株로서는 各種 穀類에서 分離되어 一次의 으로 *Aspergillus* spp.로 同定, 本 敎室에서 繼代 培養되고 있는 總 58株이 있으며, 標準菌株로서는 *Aspergillus flavus* ATCC 15517을 使用하였다.

2. 實驗에 使用된 培地 :

實驗에 使用된 培地로서는 Yokotsuka等(1967) 그리고 Nesbitt等(1962)이 screening 方法에 좋다고 주장한 Czapek-dox 培地에 Zn을 含有시킨 培地**를 使用하였다.

B. 實驗方法

1. 培養方法 :

上記 實驗材料에서 기술한 toxin生成用 培地를 各

** Screening 培地成分 :

NaNO ₃	2.0gm	FeSO ₄	0.01gm
K ₂ HPO ₄	1.0gm	ZnSO ₄	0.2gm
MgSO ₄	0.5gm	Sucrose	30.0gm
KCl	0.5gm	D.water	1,000ml
pH 6—7			

500ml 후라스크에 200ml씩 分注하고 滅菌시킨 후 各種 菌株를 2白金耳씩 接種하고 30°C에서 9日間 靜置 培養을 實施하였다.

2. Toxin 樣物質의 同定 :

(a) Toxin 樣物質의 추출 :

Toxin 樣物質의 추출방법으로서는 上記 方法에 依하여 培養된 培養液을 가제로서 여과한 후 이여과액에 여액의 1/3의 chloroform을 가하여 2時間 진탕하면서 여과액속의 chloroform溶解物質을 추출한 후, 이를 separatory funnel에 옮겨 chloroform 層만을 分離한 후 65°C 水槽上에서 농축하였으며 잔여 여과액은 上記 方法을 3회 되풀이 하여 충분한 量의 toxin 樣物質을 얻었다.

(b) Toxin 樣物質의 同定 및 分離 :

同定 및 分離方法으로서는 Thin layer chromatography (TLC)를 利用하였으며 면적 20×20cm 넓이의 chromatoplate 上에 250μ 두께의 silica gel G (Merck)를 도포한후 110°C에서 2時間 activation시킨 다음, 5μ를 spotting 하였다.

전개용 용매계로서는 chloroform: acetone (9:1)를 使用하였고, 기선으로 부터 展開하였다. 螢光物質 檢出用 ultra-violet lamp는 Ultra-Violet Prod. Inc. 製 Long-wave用 lamp를 使用(wave length 365mμ) 하였다.

이의 螢光性과 Rf值를 標準菌株의 螢光性 및 Rf值를 서로 比較하여 同定하였다.

實驗成績

實驗菌株 總58株에 對하여 螢光性 物質 生産與否와 螢光성 물질의 Thin layer chromatography上의 Rf值를 標準菌株와의 關係를 比較하여 이중 3株, 即 A-8, A-61 및 A-23의 3株가 aflatoxin 樣物質을 生成함을

볼수 있었다.

即 A-23株는 Rf值가 0.5 부근에 greenish spot가 보이는데, 이는 標準菌株인 *Aspergillus flavus* AT-CC 15517의 aflatoxin G group에 해당하였으며, A-8株 및 A-61株는 Rf值가 0.7 부근에 blue spot가 관

찰되었는데 이는 aflatoxin B group에 해당하였다.

이와같이 分離菌株들의 형광성과 Rf值를 標準菌株와의 관계를 比較하여 볼때 이는 aflatoxin樣 物質이라 추측된다(第1圖).

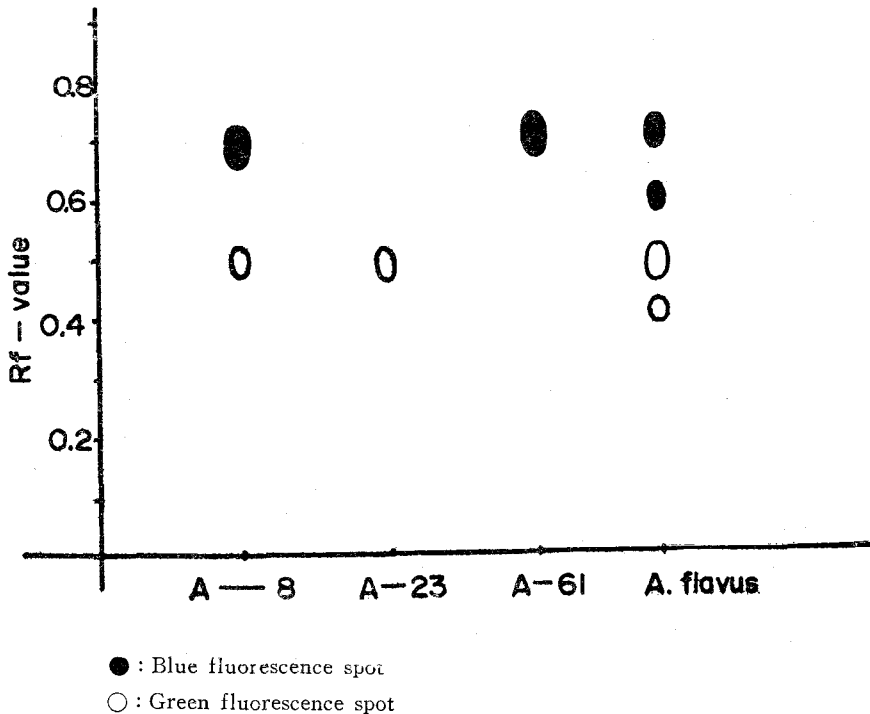


Fig.1 Chromatographic pattern of 3 strains and control(ATCC 15517 strain of *A. flavus*)

考 按

1960年 英國에서 칠면조의 集團的인 폐 죽음상태가 發生한 후 Blount(1961) 그리고 Sargeant等(1961)에 依하여 이를 Turkey-X disease라고 부르고 이의 原因菌이 *Aspergillus flavus*가 分泌하는 毒-신인 aflatoxin에 依한 結果라고 報告된 以來 여러 學者들 (Asplin 및 Cornaghan, 1961; Diener等, 1963; Hodgcs等, 1964; Hesseltine等, 1966)에 依하여 aflatoxin에 依한 動物의 피해 報告와 이에 依한 發癌性 問題가 야기되었으므로 Asao等(1963), Cheung 및 Sine (1964) 그리고 Büchi等(1966)에 依하여는 化學構造式 및 여러 物理的性質등이 알려졌으며, 現在 8種의

aflatoxin이 알려져 있다.

또한, aflatoxin의 分泌菌株, 分布, 同定 및 分析方法等도 여러 學者들에 依하여 發表되었다(Kulik 및 Holaday, 1966; Scott等, 1967; Lie 및 Marth, 1967; Schroeder, 1966).

그러나 아직까지 우리나라에서는 醱酵食品의 開發의 부진으로 自然狀態의 眞菌들을 그대로 利用하는 形편이어서 이에 對한 研究는 많이 이루어져 있지 못하다고 하겠다. 日本의 경우, Murakami等(1967, 1968)은 醱酵食品에서 分離된 *Aspergillus*에서는 aflatoxin을 發見치 못하였다고 주장한 반면, Kurata等(1968)은 aflatoxin分泌菌株의 檢出이 可能하였다고 發表하였다.

우리나라에서도 權(1969), 柳等(1970), 高 및 柳

(1970), 高等(1972) 그리고 과학기술처(1970) 등에서 연구한 報告에서는 各種 穀類 및 醱酵食品中에서 aflatoxin 分泌可能 菌株의 分離가 可能하였다고 主張하였으나, 李 및 李(1969), 李等(1971) 그리고 沈等(1969)은 aflatoxin의 檢出이 不可能하였다고 하였다.

그러나, 李等(1971)은 全國에서 수집한 486點의 試料中에서 分離한 117株의 *Aspergillus* spp.中에서 박층 크로마토그래피에 依하여 3株가 物理的 性質이 aflatoxin과 유사한 aflatoxin樣 物質을 檢출할수 있었다고 主張한것은 本 實驗에서 總 分離菌株 58株中 3株의 aflatoxin樣 物質의 檢出이 可能하였다는 點과 一致하는 點이라 하겠다.

本 實驗에서는 現在까지 알려진 aflatoxin 檢출방법의 복잡성과 어려운점들을 좀더 손쉽고 간단한 方法으로서 비교적 짧은 時間內에 많은 試料를 處理 할수 있는 方法과 同時에 screening이 可能한 方法을 모색코자 上記 實驗을 실시하였던 바 그 可能性을 시사해 주었다고 할수 있다. 이에 對한 좀 더 完全하고 正確한 方法은 더욱 研究되어야 할 問題들이며 screening test에서 특-신 汚染可能 菌株로 나타나는 菌株에 對하여서는 in-vivo 및 in-vitro test를 통한 實驗이 行하여져 확정 認知되어야 할것으로 思慮된다.

結 論

各種 穀類로 부터 分離된 58株의 *Aspergillus* spp.를 使用하여 박층 크로마토그래피의 方法을 利用하여 이 *Aspergillus* spp.들의 aflatoxin 分泌 有無를 *Aspergillus flavus* ATCC 15517을 對照群으로 삼아 screening test를 실시하였던 바 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 總 實驗菌株 58株中 3株에서 aflatoxin 樣物質의 檢出이 可能하였다.

2. 이 aflatoxin樣 物質에 對한 確定은 in-vivo 및 in-vitro test의 좀더 실험이 실시되어야 될 것이다.

3. Modified screening test는 多量의 試料中에서 aflatoxin樣物質을 檢出하는 方法의 하나로서 使用할수 있는 可能性을 나타내었다.

References

- Andrellos, P.J. and G.R. Ride (1964): Confirmatory tests for aflatoxin B₁, *J. AOAC*, **47**: 801.
- Asao, T, G. Fuchi, M.M. Abdel-Kaber, S.B. Chang, E.L. Wick, and G.N. Wogan, (1963): Aflatoxins B and G, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**: 1076.
- Ashowth, L.J. and J.L. McMeans(1966): Association of *Aspergillus flavus* and aflatoxins with a greenish yellow fluorescence of cotton seed, *Phytopath.*, **56**: 1104.
- Asplin, F.D. and R.B.A. Carnaghan(1961): The toxicity of certain groundnut meals for poultry with special reference to their effect on duckling and chickens, *Vet. Record*, **7**: 1215.
- Austwick, P.C.K. and G. Ayerst(1963): Groundnut microflora and toxicity, *Chem. Ind.*, p.55.
- Blount, W.T.(1961): Turkey "X" disease, *Turkeys*, p.52.
- Boller, R.A. and H.W. Schroeder (1966): Aflatoxin producing potential of *Aspergillus flavus-oryzae* isolated from rice, *Cereal Sci. Today*, **11**: 342.
- Broadbent, J.H., J.A. Cornelius and G. Shone(1963): The detection and estimation of aflatoxin in groundnuts and groundnut materials, *Analyst*, **88**: 214.
- Brown, J.M.M. and L. Abrams(1966): Biochemical studies on aflatoxinosis, *J. Vet. Res.*, **32**: 119.
- Brown, R.F., J.D. Wildman and R.M. Epley(1968): Temperature-dose relationship with aflatoxin on the brine shrimp *Artemia salina*, *J. AOAC*, **51**: 905.
- Buchi, G., D.M. Foulkes, M. Kurono and G.F. Michell(1966): The total synthesis of racemic aflatoxins B₁, *J. Am. Chem.Soc.*, **88**: 4534.
- Carnaghan, R.B.A., R.D. Hartley and J.O'Kelly(1963): Toxicity and fluorescence properties of the aflatoxins, *Nature*, **200**: 1101.
- Cheung, K.K. and G.M. Sim(1964): Aflatoxin G₁, *Nature*, **201**: 1185.
- Cooms, T.J., P.C. Crowther, B.J. Francis and G. Shone,(1964): The detection and estimation of aflatoxins in groundnuts and

- ground nut materials, *Analyst*, **89** : 436.
- Diener, U.L.(1960): The mycoflora of peanuts in storage, *Phytopath.*, **50** : 220.
- Hesseltine, C.W., O.L. Shotwell, J.J. Ellis and Stubblefield(1966): Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*, *Bact. Rev.*, **30** : 792.
- Hodges, F.A., J.R. Zust, A.A. Smith, B.H. Nelson, Ambrecht and A. D. Campbell(1964): Mycotoxins isolated from *Penicillium puberulum*, *Science*, **145** : 1439.
- Jackson, F.W., H. Wolf and O.R. Sinnhuber(1968): The relationship of hepatoma in rainbowtrout to aflatoxin contamination and cottonseed meal, *Cancer Res.*, **28** : 987.
- Jarvis, B.(1971): Factors affecting the production of mycotoxins, *J. Appl. Bact.*, **34** : 199.
- Kulik, M.M. and C.E. Holaday(1966): Aflatoxin, *Mycopath. Mycol. Appl.*, **30** : 157.
- Kurata, H., S. Udagawa, M. Ichinoe, Y. Kawasaki, M. Takada, A. Koizumi and H. Tanabe(1968): Studies on the population of toxigenic fungi in foodstuffs, *J. Fed. Hyg. Soc. Jap.*, **9** : 23.
- Mayura, K. and V. Sreenwasamurthy(1969): Quantitative method for the estimation of aflatoxin in peanut and peanut products, *J. AOAC*, **52** : 77.
- Mislvec, P.B., G.H. Hunter and J. Tuite (1968): Assay for aflatoxin production by the genera *Aspergillus* and *Penicillium*, *Appl. Microbiol.*, **16** : 1053.
- Murakami, H., H. Sagawa and S. Takase (1968): Non-productivity of aflatoxin by Japanese industrial strains of *Aspergillus*, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **14** : 251.
- Lie, J. L. and E.H. Marth(1967): Formation of aflatoxin in cheddar cheese by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, *J. Dairy Sci.*, **50** : 1708.
- Pons, W.A. Jr.(1969): Collaborative study on the determination of aflatoxins in cottonseed products, *J. AOAC*, **52** : 61.
- Schindler, A.F. and W.V. Eisenberg(1968): Growth and production of aflatoxins by *Aspergillus flavus* on red pepper, *J. AOAC*, **51** : 911.
- Sargeant, K., A. Sheridan, J. O'Kelly and R.B.A. Carnaghan,(1961): Toxicity associated with certain samples of groundnuts, *Nature*, **192** : 1096.
- Scott, P.M.(1968): Note on analysis of aflatoxins in green coffee, *J. AOAC*, **51** : 609.
- Scott, P.M., Van W. Walbeck and J. Forgacs (1967): Formation of aflatoxins by *Aspergillus ostianus* Wehmer, *Appl. Microbiol.*, **15** : 945.
- 高春明·柳駿(1961): 한국 저장식품의 유독성 물질과 그 방지에 관한 연구, 연세논총 **8** : 1.
- 과학기술처(1970): 한국 식품중의 발암물질의 검색에 관한 연구보고, MOST-R-70-84-PM.
- 권태완(1969): A photochemical changes of malonaldehyde by the presence of aflatoxin in model system, *J. Kor. Assoc. Food. Sc.*, **1** : 745.
- 심길순, 문장규, 오중화(1969): 한국산 식품중 mycotoxin에 관한연구, 약학회지
- 유준·고춘명·권속표·정용(1970): 한국 장식품의 유독성물질과 그 방지에 관한연구, 연세논총, **7** : 191.
- 이백함·전영연·최태주·주현규·김상재·정성구(1971): 한국산 발효식품 미생물이 분비하는 aflatoxin에 관한 연구, 건국학술지, **12** : 807.
- 이태영·이상규(1969): 한국식품중유독성 대사물질에 관하여, 한국식품과학회지, **1** : 78.